

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Eva-Maria Oja

**Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC8 puuduse mõju basaalmembraani
terviklikkusele**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Juhendajad MSc Keiu Kask

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2016

INFOLEHT

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC8 puuduse mõju basaalmembraani terviklikkusele

Imetajate närvisüsteemi areng hõlmab endas paljusid kompleksseid protsesse, mis tagavad kesknärvisüsteemile kindla struktuuri ning funktsioonid. Ventrikulaartsoonis arenevatel radiaalgliia rakkudel on üks olulisemaid rolle närvisüsteemi arengus, sest need omavad pikka jätket, mida mööda migreeruvad neuraalsed rakud neokorteksi õigetes kihtidesse. Sama oluline on neokorteksit kattev basaalmembraan, mis on barjääriks migreeruvatele rakkudele. Katkendlik basaalmembraan viib rakkude ülemigreerumiseni ning tüüp II lissentsefaalia väljakujunemiseni. Rakkude jagunemises, adhesioonis ning migreerumises mängib olulist rolli G-valkude vahendatud signaali ülekande mehhanism, kus nukleotiidivahetusfaktori RIC8 abil võimendatakse G-valgu α -subühikult saadavat signaali. RIC8 on väga tähtis hiire neurogeneesis, sest valgu puudumine viib tõsiste neuromuskulaarsete defektide tekkeni.

Märksõnad: RIC8, basaalmembraan, radiaalgliia rakud, neurogenees, tüüp II lissentsefaalia

CERCS kood: B350 Arengubioloogia, loomade kasv, ontogenees, embrüoloogia

Deletion of RIC8 from neural precursor cells influences the integrity of basement membrane

Development of mammalian nervous system holds many complex processes that ensure the specific structure and functions of central nervous system. Radial glial cells develop in the ventricular zone and have one of the most important roles in the neurogenesis, because they have processes that provide a scaffold for migrating cells. This ensures that neocortex develops correctly. Neocortex is also covered with basement membrane and aberrations in it lead to overmigration of neurons and type II lissencephaly. Many different signalling pathways are important for cells to divide, adhere and migrate. One of these are mediated by G-proteins and RIC8 that enhances the signal derived from G-protein's α -subunit. RIC8 is very important in murine neurogenesis, since mice lacking RIC8 in development have severe neuromuscular defects.

Key words: RIC8, basement membrane, radial glial cells, neurogenesis, type II lissencephaly

CERCS code: B350 Development biology, growth (animal), ontogeny, embryology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Neurogenees.....	7
1.1.1 Neokorteksi areng.....	7
1.2 Basaalmembraan	9
1.2.1 Basaalmembraani üldine iseloomustus.....	9
1.2.2 Basaalmembraani funktsioonid	10
1.3 RIC8 – guaniini nukleotiidivahetusfaktor.....	11
1.3.1 RIC8 üldine iseloomustus.....	11
1.3.2 <i>Ric8</i> geen	12
1.3.3 Heterotrimeersed G-valgud	12
1.3.4 Rakujagunemine	13
1.3.5 RIC8 funktsioon hiire arengus.....	14
1.3.6 RIC8 ja basaalmembraan.....	15
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja metoodika	17
2.2.1 Töös kasutatud hiireliinid	17
2.2.2 Embrüote dissekteerimine	17
2.2.3 Embrüote genotüpiseerimine	18
2.2.4 Parafiinlõikude valmistamine	19
2.2.5 Histoloogiliste preparaate valmistamine	19
2.2.6 Immuunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele	20
2.2.7 Koelõikude pildistamine.....	21
2.3 Tulemused.....	22

2.3.1	RIC8 puudus neuraalsetest cellarakkudest põhjustab heterotoopiate teket vanuses E13.5.....	22
2.3.2	<i>Ric8CKO</i> hiireliinil esinevad ulatuslikud verevalumid kudede vahel.....	23
2.3.3	<i>Ric8CKO</i> hiireliinil esineb basaalmembraani katkeid ning radiaalgliia jätkete morfoloogia häireid	24
2.3.4	E13.5 vanustel <i>Ric8CKO</i> hiirtel on neokorteksi esimesed kihid tekkinud.....	25
2.4	Arutelu	27
KOKKUVÕTE		31
SUMMARY		32
TÄNUSÕNAD		34
KIRJANDUSE LOETELU.....		35
LIHTLITSENTS.....		42

KASUTATUD LÜHENDID

BBB – *blood and brain barrier*, vere ja aju vaheline barjäär

BM – *basement membrane*, basaalmembraan

BSA – *bovine serum albumine*, veise seerumalbumiin

CR – Cajal-Retziuse rakk

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool

E – *embryonic day of development*, embrüonaalne arengupäev

ECM – *extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

FAK – *focal adhesion kinase*, fokaalne adhesioonikinaas

GEF – *guanine nucleotide exchange factor*, guaniini nukleotiidivahetusfaktor

G-valgud – guaniini nukleotiidi siduvad valgud

GPCR – *G-protein coupled receptor*, G-valguga seotud retseptor

IZ – *intermedial zone*, intermediaalne tsoon

KNS – kesknärvisüsteem

MZ – *marginal zone*, marginaaltsoon

NEC – *neuroepithelial cell*, neuraalne epiteliaalne rakk

PBS – *phosphate-buffered saline*, fosfaatpuhvriga soolalahus

PFA – paraformaldehüüd

RGC – *radial glial cell*, radiaalgliia rakk

RIC8 – *resistant to inhibitors of cholinesterase 8*

Ric8CKO – *Ric8* konditsionaalne *knock-out* hiireliin

RM – Reichert'i membraan

SVZ – *subventricular zone*, subventrikulaartsoon

VZ – *ventricular zone*, ventrikulaartsoon

SISSEJUHATUS

Imetajate närvisüsteemi areng hõlmab endas paljusid kompleksseid protsesse, mis tagavad kesknärvisüsteemile kindla struktuuri ning funktsioonid. Õppimis- ning tajufunktsioonide ja teadvuse ning tunnetusliku käitumise eest on vastutav evolutsiooniliselt uudne aju regioon – suurajukoor ehk neokorteks. Arengu vältel omandab neokorteks 6-kihilise struktuuri. Korrektseks arenguks on olulised nii embrüosisesed kui -välised signaalid. Neurogeneesil tagatakse neuronite tekkeks vajalik rakupopulatsioon eellasrakkude paljunemisega ventrikulaartsoonis. Seal asuvad ka kriitiliselt olulised radiaalglia rakud, mille jätked on toeks ja suunajaks tekkinud neuronitele, mis peavad migreeruma neokorteksi õigetesse kihtidesse. Neuraalsete rakkude migreerumise lõpp-punkti jõudmisel on funktsionaalse tähtsusega basaalmembraanid, mis analoogselt plasmamembraanile kaitsevad kudesid füüsilise stressi eest ja võimaldavad infovahetust raku ja teda ümbritseva keskkonna vahel. Arengu käigus tekkivad basaalmembraani defektid võivad viia tõsiste arenguhäireteni nagu tüüp II lissentsefaalia välja kujunemisele ning embrüonaalse letaalsuseni. Tüüp II lissentsefaalia puhul on basaalmembraan katkendlik ja neuronid migreeruvad pehmekesta (*pia mater*) pinnale, kus nad moodustavad munakivi-sarnaseid (*cobblestone*, munakivi) väljakasve.

Rakkude migreerumises, adhesioonis ning jagunemises mängivad olulist rolli paljud erinevad signaalvõrgustikud, mis vahendavad signaali ülekannet rakuvälisest keskkonnast rakku. Üheks neist on G-valkude vahendatud signaali ülekande mehhanism. Heterotrimeersed G-valgud on membraanseoselised ja signaali ülekande toimub guaniini nukleotiidi vahetuse ja hüdrofüüsi kaudu. Seda kontrollivad omakorda guaniini nukleotiidivahetusfaktorid, millest üheks olulisemaks on RIC8. RIC8 pikendab ja võimendab $G\alpha$ subühiku poolt saadavat signaali. Embrüogeneesis on RIC8-l palju rolle ning valguga väljalülitamine on embrüonaalselt letaalne. Katseliselt on näidatud, et RIC8 on olulise tähtsusega ka hiire neurogeneesis, kus valguga puudumine viib tõsiste neuromuskulaarsete defektideni. Seetõttu on RIC8 uurimine hiire arengus väga oluline.

Käesoleva bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade koduhiire (*Mus musculus*) varajasest neurogeneesist, rakkude migratsioonist ning basaalmembraani rollist närvisüsteemi arengus. Eksperimentaalses osas keskendutakse neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise konditsionaalse hiireliini *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* uurimisele vanuses E13.5, et määrata võimalike basaalmembraani defektide esmane teke.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Neurogenees

1.1.1 Neokorteksi areng

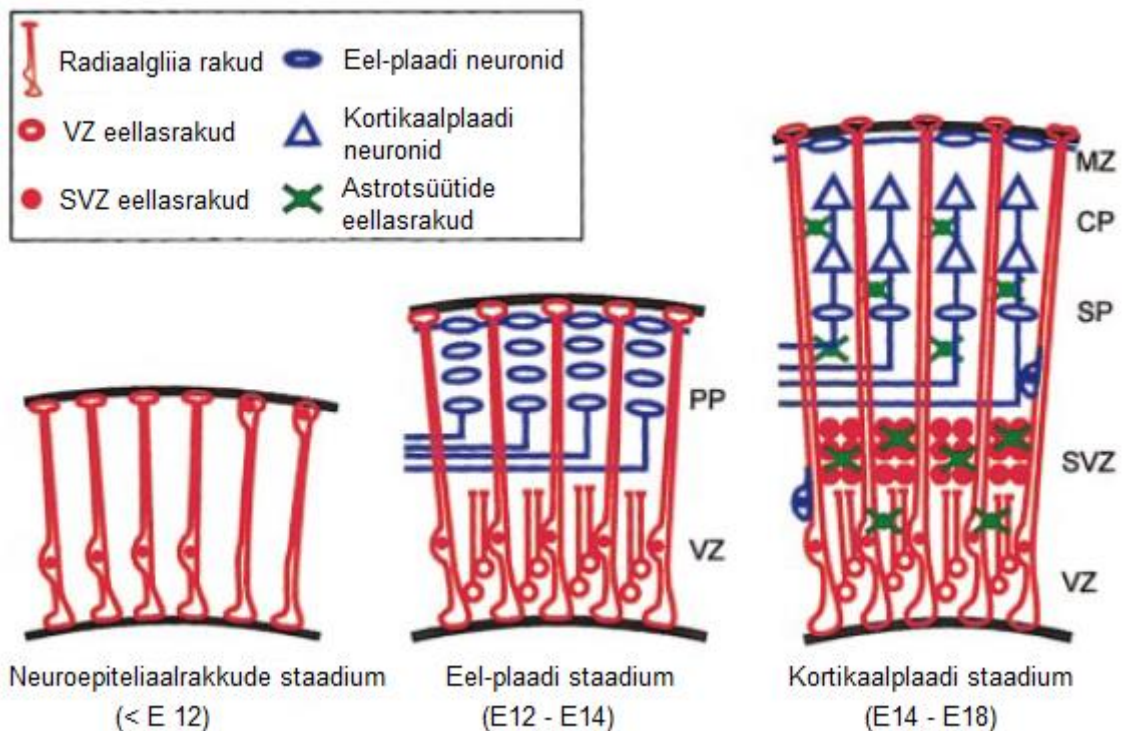
Neurogenees hõlmab endas paljusid protsesse, mis tagavad kesknärvisüsteemile (KNS) kindla struktuuri ja funktsiooni (Graus-Porta jt, 2001; Hartenstein ja Stollewerk, 2015). KNS-i funktsioneerimiseks on oluline neuraalsete rakkude, neuronite ja gliiarakkude, moodustumine (Kandel jt, 2000; Götz ja Huttner, 2005). Sellele annab aluse korrektselt läbitud neurogenees, mis hõlmab endas mitmeid protsesse, nagu neuraalsete eellasrakkude jagunemine, diferentseerumine neuraalseteks rakkudeks, neuronite migreerumine ning rakkudevaheliste võrgustike loomine (Bjornsson jt, 2015). Nende protsesside toimumise seisukohast on üheks enim uuritavamaks struktuuriks KNS-is neokorteks. Imetajate neokorteks on kõrgelt organiseeritud 6-kihiline struktuur, mille moodustavad erinevad neuronid ja gliiarakud (Nadarajah jt, 2001; Olson ja Walsh, 2002; Molyneaux jt, 2007) ning mis vastutab tunnetuslike, õppimis- ja tajufunktsioonide eest (Molyneaux jt, 2007). Neokorteksi kuus kihti saavad moodustuda paljude kaasfaktorite mõjul kontrollitud mikrokeskkonnas korrektse rakujagunemise, õigeaegse migratsiooni ning täpse positsioneerimise tulemusena (Nadarajah jt, 2001; Kuo jt, 2005).

Närvisüsteem hakkab koduhiire (*Mus musculus*) arengu käigus arenema 9. embrüonaalsel päeval (E9, *embryonic day 9*) (Anthony ja Heintz, 2008). Normaalse arengu eelduseks on gastrulatsiooni käigus tekkinud ektoderm, millest saab alguse neuraalplaat ning mis voltub kokku neuraalторуks (Kandel jt, 2000). Neuraalтору anteriorsest osast areneb peaaegu ning posterioorsest osast seljaaju (Kandel jt, 2000). Erinevate neuraalsete eellasrakkude tootmine toimub otsaju arengus neuraalтору lumenipoolses osas ventrikulaar- ja subventrikulaartsoonis (VZ, *ventricular zone*; SVZ, *subventricular zone*) (Noctor jt, 2004; Götz ja Huttner, 2005; Kriegstein, 2005; Bjornsson jt, 2015). Rakkude jagunemised VZ-s võivad olla sümmeetrilised või asümmeetrilised. Sümmeetriliste rakkude jagunemistega suurendatakse neuraalsete eellasrakkude hulka. Nii jagunevad VZ-s neuraalтору vooderdavad apiko-basaalselt polariseeritud epiteliaalsed rakud (NEC, *neuroepithelial cell*) (Noctor jt, 2004; Franco ja Müller, 2013). Vanuses E9–E10 toimub NEC-ide üleminek radiaalgliia rakkudeks (RGC, *radial glial cell*), mis on samuti apiko-basaalsed rakud, omades jätkeid, mis on seotud valendiku

poolse pinnaga ning basaalmembraaniga pehmekelme (*pia mater*) pinnal (Noctor jt, 2002; Pinto ja Götz, 2007; Franco ja Müller, 2013). Selles vanuses suureneb ka asümmeetriliste jagunemiste osakaal (Noctor jt, 2004), mille käigus jääb üks tütarakkudest eellasrakuks ning teisest saavad SVZ-i migreeruvad basaalsed eellasrakud, mis omakorda sümmeetriliselt jagunedes tekitavad neuroneid või uusi basaalseid eellasrakke. Seda nimetatakse ka kaudseks neurogeneesiks. (Kowalczyk jt, 2009) Kõik nimetatud rakutüübid läbivad ka otsest neurogeneesi ehk jagunemiste tulemusena tekivad eellasrakkudest postmitootilised neuronid, kuid seeläbi väheneb ka jagunemisvõimeliste neuraalsete eellasrakkude hulk (Noctor jt, 2004; Götz ja Huttner, 2005; Miyata jt, 2010).

Vastsündinud neuronid migreeruvad mööda radiaalgliaa jätkeid lainetena lokomotsiooni või tuuma translokatsiooni abil (Nadarajah jt, 2001; Kuo jt, 2005; Haubst jt, 2006; Yurchenco, 2011). Lokomotsiooni käigus kasutab migreeruv neuron RGC basaalsel jätket, millele kinnituses liigub rakk areneva neokorteksi õigesse kihti (Nadarajah jt, 2001; Kriegstein ja Noctor, 2004). Translokatsiooni puhul omab migreeruv rakk pehmekelmele kinnitunud pikka basaalsel jätket ning VZ-st vabanenud apikaalset jätket ja rakukeha koos tuumaga tõmmatakse migratsiooni lõpp-punkti (Nadarajah jt, 2001). Põhilise migratsiooni tüübina vanuses E12–E13 kasutavad migreeruvad rakud lokomotsiooni (Gupta jt, 2002). Neurogeneesi edenedes neurogeneesi tippfaasis ning neokorteksi kihtide aktiivse tekke ajal domineerib VZ pool tuuma translokatsioon ning pehmekelmele lähemates kihtides taas lokomotsioon (Gupta jt, 2002).

Neokorteksi kihtide teke toimub hiire arengus arengupäevadel E11–E18 (Joonis 1). E11 vanuses toimub areneva neokorteksi VZ-s eellasrakkude jagunemine. (Gupta jt, 2002) Vanuses E12.5 arengupäeva migreerub esimene postmitootiliste neuronite laine VZ-st ning moodustub eelplaat VZ ja ajukelme vahele (Gupta jt, 2002; Olson, 2014). E13 vanuses lahkub VZ-st teine postmitootiliste neuronite laine ning eelplaat jaguneb pealmiseks MZ-ks ja alumiseks alamplaadiks, mille vahele jääb kortikaalplaat (Hartfuss jt, 2001; Gupta jt, 2002; Kriegstein ja Noctor, 2004; Olson, 2014). E14 ning E18 arengupäeva vahel jätkavad rakud migreerumist, et läbida alamplaat ja moodustada järgmisi neokorteksi kihte (Gupta jt, 2002). Postmitootilised neuronid migreeruvad seest-välja põhimõttel: alumiste neokorteksi kihtide (kihid VI ja V) neuronid tekivad varem kui ülemiste kihtide (kihid IV, III ja II) neuronid (Franco ja Müller, 2013). Kui kõik neokorteksi kihid on moodustunud, siis alamplaat degenereerub (Gupta jt, 2002).



Joonis 1. Neurogeneesi skeem arenevast hiire neokorteksist. Neurogeneesi alguses neuroepiteelirakkude staadiumis on bipolaarse neuroepiteeli rakkude lühike apikaalne jätke VZ-s ja pikem basaalne jätke ühenduses pehmekelme BM-iga (vasakpoolne joonis). Varajases neurogeneesis tekivad eelplaadi (PP, *preplate*) neuronid, mis asustavad pehmekelme aluse pinna. RGC-d jäävad sarnaselt neuroepiteeli rakkudega ühendatuks BM-iga (keskmine joonis). Hilisemates neurogeneesi staadiumites moodustuvad eelplaadi keskele kortikaalplaadi neuronid (kihid II–VI). Tekkinud neuronid migreeruvad mööda RGC-sid. Moodustub ka SVZ (parempoolne joonis). (modifitseeritud Hartfuss jt, 2001)

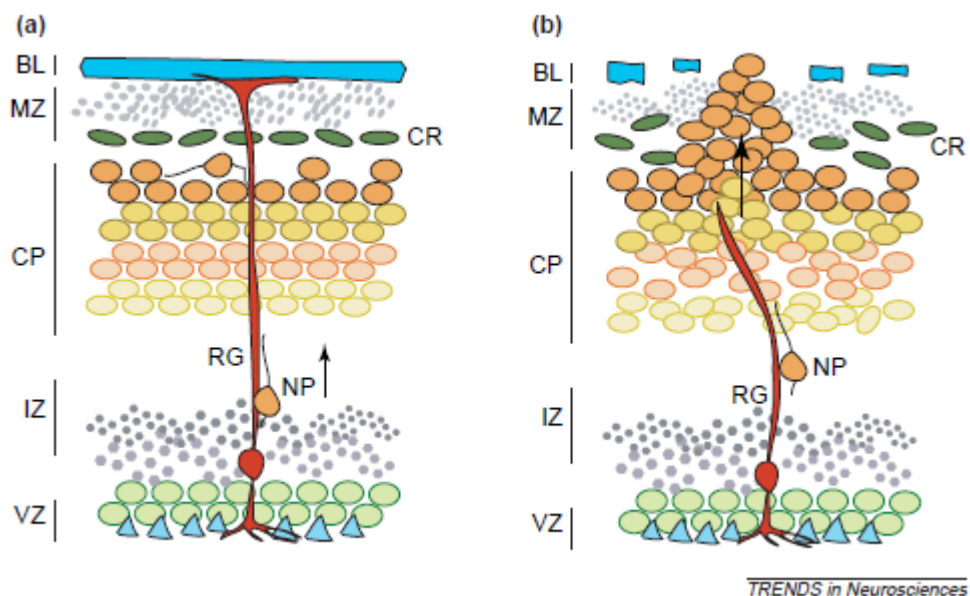
1.2 Basaalmembraan

1.2.1 Basaalmembraani üldine iseloomustus

Basaalmembraan (BM, *basement membrane*) on kõrgelt spetsialiseerunud ekstratsellulaarne maatriks (ECM, *extracellular matrix*), mis katab enamikku kudesid ja koosneb peamiselt laminiinidest, tüüp-IV kollageenist, nidogeenist, proteoglükaanidest (Erickson ja Couchman, 2000) ning kasvufaktoritest (Haubst jt, 2006). BM-id on analoogsed plasmamembraanile, kaitstes kudesid füüsilise stressi eest ning võimaldades infovahetust raku ja teda ümbritseva keskkonna vahel (Yurchenco, 2011). Signaalide edasiandmine toimub suuresti integriinide, düstroglükaanide ning kasvufaktorite vahendusel (Colognato jt, 2005; Haubst jt, 2006; Yurchenco, 2011)

1.2.2 Basaalembraani funktsioonid

Üheks olulisemaks BM-i funktsiooniks on rakkude sidumine BM-ile, mis tagab tõhusa infovahetuse raku ja teda ümbritseva keskkonna vahel peamiselt laminiin-integriin või laminiin-düstroglükaan ühenduste kaudu (Yurchenco, 2011). BM-i komponendid mõjutavad raku bioloogilist aktiivsust ja membraanile seondumist (Yurchenco, 2011). BM on evolutsiooni käigus konserveerunud kõikidel hulkraksetel organismidel ning mutatsioonid BM-i komponentides on embrüonaalselt surmavad või võivad viia tõsiste arengudefektideni (Halfter ja Yip, 2014). Mutatsioonid, mis mõjutavad laminiinide ekspressiooni, laminiinide seondumissaiti, ECM-is paiknevaid $\alpha 6$ - ja $\beta 1$ -integriine, düstroglükaane või integriiniga seonduvaid kinaase (ILK, *integrin linked kinase*), viivad radiaalgliia ja BM-i ühenduse katkemisele (Georges-Labouesse jt, 1998; Graus-Porta jt, 2001; Halfter jt, 2002; Beggs jt, 2003; Niewmierzycka jt, 2005). Katkenud ühendus ei võimalda aga neuraalsete rakkude korrektset migreerumist ning täpset neokorteksi kihtide teket, mis omakorda viib rakkude ülemigreerumiseni ja *cobblestone*'i ehk tüüp II lissentsefaalia väljakujunemisele (Yurchenco, 2011). Lissentsefaalia on kaasasündinud haigus, mille puhul on häiritud BM-i terviklikkus ning rakkude migreerumine. Tüüp II lissentsefaalia puhul ei ole BM terviklik ning neuronid migreeruvad pehmekelme pinnale, kus nad moodustavad munakivi-sarnaseid (*cobblestone*, munakivi) ektoopiaid. (Olson ja Walsh, 2002; Joonis 2b)



Joonis 2. BM-iga seotud laminiinide olulisus arenevas neokorteksis. (a) Neokorteksi arenedes käituvad radiaalgliia rakud (RG, punane) nii neuraalse eellasrakuna kui ka toesena migreeruvatele neuraalsetele rakkudele (NP, oranž). Radiaalgliia on ühenduses pehmekelme BM-iga (BL, sinine) ning laminiinirikaste aladega VZ-is (sinised kolmnurgad). Korrekse kortikaalse arengu korral migreeruvad neuraalsed rakud läbi intermediaalse

tsooni (IZ, *intermediate zone*) seest-välja põhimõttel ning moodustavad areneva kortikaalplaadi (CP). Lõpuks eemalduvad nad radiaalgliia toesest MZ-s, kus paiknevad ka Cajal-Retziuse rakud (CR). (b) Rakud ei saa korrektselt migreeruda, kui laminiini või laminiini retseptorite hulk on häiritud. Sellisel juhul katkeb ühendus radiaalgliia ja BM-i vahel, mistõttu on neuraalsetel rakkudel võimalik migreeruda kortikaalplaadist edasi MZ-i ning tekitada rakkude kogumikke aju pinnal. (Colognato jt, 2005)

BM on vahendajaks ka vere ja aju vahelisele barjäärile (BBB, *blood and brain barrier*). BBB põhikomponendiks on kapillaaride endoteeli rakud ning peritsüüdid (Bergers ja Song, 2005; Abbott jt, 2010). BBB loob neuraalseteks funktsioonideks sobiliku mikrokeskkonna, vahendab toitaineid ja ioone aju ning vere vahel ja hoiab ära mitmete makromolekulide sattumise aju. BM võimaldab neuronitel ühenduda silelihasrakkudega ja seeläbi kontrollida aju verevahetust. (Abbott jt, 2010)

1.3 RIC8 – guaniini nukleotiidivahetusfaktor

1.3.1 RIC8 üldine iseloomustus

RIC8 (*resistant to inhibitors of cholinesterase 8*) on evolutsiooni käigus konserveerunud tsütosoolne guaniini nukleotiidivahetusfaktor (GEF, *guanine exchange factor*) (Miller jt, 2000, Tall jt, 2003). RIC8 on 63 kDa suurune valk, mis leiti esmakordselt ümarussi *Caenorhabditis elegans* mutageneesi uuringutel, mille käigus otsiti mutatsioone geenidel, mis on olulised signaali ülekandeks ühelt neuronilt teisele (Miller jt, 1996, Miller ja Rand, 2000). *C. elegans*'i geneetilised uuringud osutasid faktile, et RIC8 seondub G-valkudega, kus füüsilist seondumist näidati esialgu imetajate G-valkudega. Imetajatel leiti kaks *C. elegans*'i RIC8 paralooži, RIC8A ja RIC8B, mis identifitseeriti pärmiga läbi viidud katsete käigus. Nende katsete eesmärgiks oli tuvastada uusi ühendeid, mis interakteeruvad aktiveeritud GTP-ga seotud $G\alpha$ subühikutega $G\alpha_o$ ja $G\alpha_s$ -iga. (Klattenhoff jt, 2003; Tall jt, 2003). Eksperimentide tulemusena leiti, et RIC8A ja RIC8B seonduvad erinevatele $G\alpha$ subühikutele, ühiseks oli vaid $G\alpha_q$ -subühik (Tall jt, 2003).

1.3.2 *Ric8* geen

C. elegans'il ja harilikul äädikakärbsel (*Drosophila melanogaster*) on kirjeldatud üks *ric8* geen, imetajatel on kirjeldatud geeni kaks paraloogi: *Ric8* (*Ric8a*) ja *Ric8b*. (Tall jt, 2003) *Ric8* geen ja selle paraloogid on leitavad paljudes organismides, kuid asukoht on kõigis erinev. Näiteks asub *Ric8* koduhiire (*Mus musculus*) 7. kromosoomis ning sisaldab 10 eksonit (NCBI), *Ric8b* seevastu 10. kromosoomis 13 eksoniga (NCBI). *C. elegans*'il paikneb *ric8* 4. kromosoomis ja sisaldab 11 eksonit (NCBI). Inimesel (*Homo sapiens*) on *RIC8a* geen 11. kromosoomis 10 eksoniga. (NCBI), selle paraloog *RIC8b* asub aga 12. kromosoomis ning sisaldab 16 eksonit (NCBI).

1.3.3 Heterotrimeersed G-valgud

Heterotrimeersed guaniini nukleotiidi siduvad reguleerivad valgud ehk G-valgud on membraanseoselised valgud, mis vahendavad signaali ülekannet rakuvälisest keskkonnast rakku (Tall jt, 2003; Bastiani ja Mendel, 2006). Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest subühikust: α -subühikust, mis seob ja hüdrolyüsib GTP-d, ning β -subühikust ja γ -subühikust, mis moodustavad omavahel dimeeri (Neer, 1995). Signaali ülekanne toimub guaniini nukleotiidi vahetuse ja hüdrolyüsi kaudu (Joonis 3) ning selleks on vaja heterotrimeersed G-valgud aktiveerida. See saavutatakse G-valguga seotud retseptorite (GPCR, *G-protein coupled receptor*) aktiveerimise kaudu. GPCR-id on plasmamembraanis paiknevad valgud, millel on seitse korda plasmamembraani läbiv domeen. GPCR-id käituvad guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*), mis seonduvad GDP-ga seotud inaktiivsele G-valgule ning stimuleerivad GDP vabanemist α -subühikult. (Tall jt, 2003; Bastiani ja Mendel, 2006) GDP-ga seotud α -subühik on inaktiivses vormis ning ühinenud $\beta\gamma$ -subühikuga. Kui retseptor saab keemilise või füüsilise signaali, siis ta aktiveerub ja muudab oma konformatsiooni. Retseptori konformatsiooni muutudes vahetub α -subühikul GDP GTP vastu ning subühik aktiveerub ja eemaldub $\beta\gamma$ -subühikust. Nii G-valgu α -subühik kui $\beta\gamma$ -subühik saavad seejärel reageerida erinevate efektoritega. Heterotrimeerne seisund taastub, kui GTP hüdrolyüsib taas GDP-ks. (Neer, 1995; Tall jt, 2003)

2005). Imetajarakkudes on näidatud, et RIC8 puudus põhjustab mitoosikävi liikumise vähenemist ning mitoosiaresti (Woodard jt, 2010).

Immuunsüsteem

RIC8 mõju on uuritud ka immuunsüsteemis, kus ta mõjutab $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{13}$, ja $G\alpha_q$ normaalset taset hematopoeetilistes rakkudes, kuid $G\alpha_{12}$ taset mitte. On leitud, et RIC8 puudus immuunsüsteemi rakkudest põhjustab hiirtel kerget aneemiat ning vähendab nende eluiga, lisaks ka B-rakkude arvukust lümfisõlmedes ja Peyer'i naastudes. Samuti on häirunud B-rakkude areng põrnas, nende diferentseerumine ja kemotaksis. Avastati, et T-rakkude areng toimub RIC8 puudusel normaalselt ning sekundaarsed lümfoidorganid sisaldasid normaalsel hulgal T-rakke. (Boultan jt, 2015)

1.3.5 RIC8 funktsioon hiire arengus

Paljudel *Ric8*-mutantsetel hiire embrüotel esinevad erinevates arenguetappides ja organites defektid, mis põhjustavad embrüonaalset hukkumist. Embrüod, kellel on välja lülitatud *Ric8* kõikidest keharakkudest, jõuavad arengus gastrulatsioonini, kuid surevad E6.5–8.5 päeva vanuselt ulatuslike gastrulatsiooni defektide tõttu. (Tõnissoo jt, 2010)

Hiire embrüonaalses arengus on *Ric8* tugevalt neurospetsiifiline ning ekspresseerub kraniaalganglionides, neuraaltorus, spinaalganglionides ja mitmes areneva aju piirkonnas (Tõnissoo jt, 2003). Täiskasvanud hiirtel omab RIC8 rolli mälu ning käitumise regulatsioonis ning on ekspresseerunud näiteks neokorteksis, vöökäärus, hipokampuses ja väikeajus (Tõnissoo jt, 2003). *Ric8* haplodefitsiitsetel hiirtel sageneb ärev käitumine ning vähenes ruumiline mälu (Tõnissoo jt, 2006). RIC8 puudusel tekivad hiirtel arengu käigus ka tõsised neuromuskulaarsed defektid. Postmitootiliste neuronite spetsiifiliste konditsionaalsete *Synapsin;Ric8^{lacZ/lox}* hiirtel on häiritud neuromuskulaarne ühendus, mille tagajärjel lihased atrofeeruvad ning põhjustavad hüpoaktiivsust ja postnataalset suremust. (Ruisu jt, 2013) Neuraalsete eellasrakkude spetsiifiline RIC8 eemaldamine tekitab embrüonaalselt näo- ja kolju arenguhäireid vanuses E10.5 ning neuromuskulaarseid häireid vastsündinud hiirtes, kus *Nes;Ric8a^{CKO}* hiired lamasid ühe külje peal passiivselt ning surid 12 h jooksul pärast sündi (Kask jt, 2015).

Ric8b ekspresseerub tavaliselt sensoorsetes lõhna edastavates neuronites ja seondub $G\alpha_{olf}$ -ga (Von Dannecker jt, 2005), mis omakorda tugevdab lõhnaretseptorite ekspressiooni heteroloogsetes rakkudes. Arvatakse, et RIC8B võib olla oluline ka endogeensele lõhnasignaalirajale. Seetõttu peaks RIC8B avaldumine tagama parema lõhnaainete äratundmise lõhnaretseptorite poolt. (Von Dannecker jt, 2006)

1.3.6 RIC8 ja basaalmembraan

Viimaste aastate vältel on hakatud uurima RIC8 osalust BM-i terviklikkuse hoidmises. Embrüo varases arengus on Reichert'i membraan (RM) barjääriks ema vere ja embrüo vahel, vahendades nii toitaineid kui gaase. Katsed Laminiin-1-ga on näidanud, et laminiini hulk RM-il oli võrreldav nii E7.5 *Ric8*^{-/-} embrüotel kui kontrolleembrüotel. RM oli ka mõlemal juhul terve, kuid *Ric8*^{-/-} embrüote korral leidis Laminiin-1 vistseraalse endodermi ja RM-i vahel, kus kontrolleembrüotel ekspressioon puudus. (Tõnissoo jt, 2010) Lisaks on leitud ka, et vistseraalse endodermi Laminiin-1 lokalisatsioon on katkendlik ja fragmenteerunud või isegi puudu. (Tõnissoo jt, 2010).

BM-i terviklikkust on uuritud ka väikeajus. Väikeaju moodustavad järgnevad erinevad rakukihid: molekulaarkiht, Purkinje rakkude kiht ja granulaarkiht (Sillitoe ja Joyner, 2007; Ma jt, 2012). Taoline kihistumine on võimalik granulaarsete eellasrakkude migreerumisele välimisest kihist sisemisse kihti (Sillitoe ja Joyner, 2007). Väikeajus ekspresseerub *Ric8* laialt molekulaar- ja granulaarkihis ning nende vahel asuvates Bergmanni glias ja Purkinje rakkude kehaades (Tõnissoo jt, 2003; Lein jt, 2007; Ma jt, 2012). *Ric8* deleteerimine väikeajust viib tõsiste defektideni väikeaju sagarike moodustumises, granulaarrakkude migratsioonis, Purkinje rakkude lokaliseerumises ja Bergmanni gliia toese organiseerumises (Ma jt, 2012). *Ric8a* mutatsioon ei mõjuta eriliselt granulaarrakkude eellasrakkude jagunemist, kasvu ega diferentseerumist (Ma jt, 2012). Väikeajus mõjutab RIC8 ka basaalmembraani korrektset moodustumist väikeaju sagarike kurdude tekkeks nii embrüonaalses kui ka sünnijärgses arengus (Ma jt, 2012). Väikeajus on BM-i terviklikkuse tagamiseks samuti olulised integriinid (Graus-Porta jt, 2001) ja laminiinid (Radner jt, 2012), mille geenides mutatsioonide esinemise korral on häiritud BM-i terviklikkus ja tekivad neuraalsed ektoopiad. *Ric8a;hGFAP-Cre* mutantsetel embrüotel leiti, et BM on väikeaju välimisel küljel olemas, kuid osaliselt katkendlik ning Bergmanni gliia ei ole ühenduses BM-iga. *Ric8a* mutantsetel embrüotel on BM osaliselt väikeaju pinnal puudu, kuid olemasolu korral terviklik. (Ma jt, 2012)

Kask jt leidsid, et otsaju BM-i korrektne moodustumine on RIC8 puudusel häiritud. Katsetest Laminiin-1 selgus, et neurogeneesi algfaasis, E12.5 vanustel *Ric8*-mutantsetel ja kontrollembriotel, on BM intaktne. Seevastu neurogeneesi tippfaasis, vanuses E14.5, oli aga märgata, et kontrollembriote BM on terviklik ja ühtlane, kuid *Nes;Ric8a^{CKO}* embrüotel katkendlik ja fragmenteerunud. Vastsündinud (P0) kontrollhiirte BM oli samuti terviklik ning ühtlane, erinevalt *Nes;Ric8a^{CKO}* hiirtest, kelle BM oli praktiliselt olematu ning Laminiin-1 lokalisatsioon täielikult fragmenteerunud. Nii E14.5 kui P0 vanuses *Nes;Ric8a^{CKO}* hiirte BM-i katkete juures oli näha ka rakkude kortikaalseid ektoopiaid. (Kask jt, 2015)

2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

2.1 Töö eesmärgid

1. Uurida *NesCre;Ric8^{lacZ/lox}* hiireliini vanuses E13.5, et tuvastada esmased BM katked.
2. Kirjeldada radiaalgliia jätkete ühendust BM-iga ja nende morfoloogiat.
3. Iseloomustada vanuses E13.5 areneva neokorteksi kihtide teket *NesCre;Ric8^{lacZ/lox}* hiireliinis.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud hiireliinid

NestinCre;Ric8^{lacZ/lox} neurospetsiifilise konditsionaalse hiireliini saamiseks kasutati hiireliine:

1. *NestinCre* – transgeenne hiireliin, kus on Cre-rekombinaasi ekspressioon hiire *Nestin* promootori kontrolli all.
2. *Ric8^{lox/lox}* – transgeenne hiireliin, kus on loxP järjestuste vahele asetatud märklaudgeen *Ric8*, mille tunneb ära koospetsiifiline Cre-rekombinaas.
3. *Ric8^{lacZ/+}* – lacZ *knock-in* hiireliin, kus reportergeen *lacZ*, millelt sünteesitava β -galaktosidaasi ekspressioon jälgendab *Ric8* ekspressiooni, on viidud *Ric8* lookusesse.

Bakalaureusetöös kasutati katseloomi Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele vastavalt (FELASA). Loomadega tegelesid ja neid ohverdasid vastavalt EL direktiivile 2010/63/EU koolituse läbinud ja loomkatse luba omavad isikud. Kõiki eksperimendis kasutatud hiiri hoiti standardsetes laboritingimustes, kus neile tagati ööpäevaringselt vabalt kättesaadav söök ja jook.

2.2.2 Embrüote dissekteerimine

Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud hiireembrüod olid embrüonaalses vanuses 13,5 arengupäeva. Vaginaalse limakorgi ilmunise järel emashiirel pärast kopulatsiooni loeti embrüote vanuseks 0,5 päeva (E0.5). Embrüod eemaldati emakasarvedest ning asetati 1x

fosfaatpuhvrisse soolalahusega (PBS, *phosphate-buffered saline*). Järgnevalt eemaldati embrüotelt lootekestad ning võeti genotüpiseerimiseks rebukotist koeproov. Embrüod pesti 1x PBS-iga ning asetati üleöö 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusesse.

2.2.3 Embrüote genotüpiseerimine

Embrüote genotüübi määramiseks kasutati dissekteerimisel eraldatud rebukoti koematerjali, millele kanti peale 100 µl lüüsilahust. Lüüsilahus koosnes proteinaas K lahusest (187 ng/µl), 10x lüüsipuhvrist (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.02% Tween 20) ja destilleeritud veest (ddH₂O). Koematerjali ja lüüsilahuse segu segati vortexil ning asetati 56°C juurde üleöö inkubeerima. Järgmisel päeval inaktiveeriti proteinaas K 20 minuti jooksul 96°C juures. Seejärel tsentrifuugiti lüüsilahus 10 min vältel 13000 p/min (Heraeus Instruments Biofuge Pico, Rotor w/ClickSeal lid). Embrüote genotüüp määrati PCR-i meetodil.

PCR-i läbiviimisel kasutati järgnevaid alleelspetsiifilisi praimereid:

NestinCre

NestinCre1 5' – AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC – 3'

NestinCre2 5' – CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG – 3'

Ric8^{LacZ/+}

LacZ300 5' – CGCATCGTAACCGTGCATCT – 3'

Ric8PTGgenoF 5' – CTCTCCCAGCATCCCTCAC – 3'

PTGin1rew 5' – CACACCCCAGCCGAGTTG – 3'

Ric8^{lox/lox}

RicCreGenoF 5' – GGTAGGGCTCAATGTTGG – 3'

RicCreGenoR 5' – GCCAAACAATCTCTCGAACC – 3'

PCR-i reaktsioonisegus olid järgnevad komponendid: 10x TaqBuffer (NH₄)₂SO₄-ga, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, Taq-polümeraas (5U/µl), ddH₂O, 0,5 µl DNA-d, praimereid. Reaktsioonisegu oli kokku 10 µl, mis pandi PCR-i masinasse (Biometra Thermocycler).

PCR-i läbiviimise tingimused:

95°C 5 minutit

95°C 30 sekundit

58°C 40 sekundit

72°C 1 minut

32 tsüklit

72°C 10 minutit

4°C hoidmine

PCR-iga saadud tulemused analüüsiti geelelektroforeesil, mille käigus jooksutati reaktsiooniprodukte 1% või 1,5% TBE (Tris-Boraat-EDTA) agarosgeelil, mis sisaldas 7,5 µl etiidiumbromiidi. Pikkusmarkerina kasutati 1 kb DNA *ladder*'it.

2.2.4 Parafiinlõikude valmistamine

Parafiinlõikude valmistamiseks kasutati eelnevalt parafiini sisestatud embrüoid. Parafiinblokkidest lõigati mikroomiga (Microm HM 355S) 8 µm seerialõigud. Lõigud asetati adhesiivsetele alusklaasidele (Menzel-Gläser) ja lasti kuivada ning kinnitada 37°C juures 24 tundi. Parafiinlõigud säilitati edasisteks katseteks 4°C juures.

2.2.5 Histoloogiliste preparaate valmistamine

Histoloogiliste preparaate tegemiseks teostati hematoksülin-eosiin värving. Selleks hoiti esmalt preparaate 30 min 60°C juures, et lõigud oleksid tugevalt alusklaasile kinnitunud. Seejärel kanti preparaatile 3x5 minutiks ksüloom, et lõigud deparafiniseerida. Preparaate rehüdreerimiseks kasutati kahaneva kontsentratsiooniga alkoholirida, kus erinevate kontsentratsioonidega etanool (100%, 96%, 90%, 70%, 50%) kanti lõikudele 2 minutiks. Seejärel kanti 1 minutiks lõikudele ddH₂O. Kõigepealt värviti rakkude tuumad hematoksüliiniga 10 minuti vältel sinakaks. Pärast värvingut loputati üleliigne hematoksülin lõikudelt maha ning asetati fikseerumiseks 10 minutiks kraanivette. Järgnevalt kanti lõikudele

2-3 minutiks eosiin, mis värvis rakkudes tsütoplasmat. Üleliigne värv loputati värvunud lõikudelt maha ning asetati taas kraanivette fikseeruma. Värvingu lõppedes teostati lõikudele dehüdreerimine kasvava kontsentratsiooniga alkoholireaga. Esmalt kanti lõikudele korra 70%-ne etanool. Järgnevalt kasutati 96% ja 100% etanooli, mis mõlemad olid lõikudel 2x1 min. Viimaks kanti lõikudele 2x2 minutiks ksülool ning värvitud lõigud sulundati Kanada palsamiga ja kaeti ettevaatlikult katteklaasiga.

2.2.6 Immuunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele

Immuunohistokeemilise reaktsiooni teostamiseks kuumutati esmalt parafiinlõike 30 min 60°C juures, et lõigud oleksid tugevalt kinnitunud alusklaasile. Koelõigud deparafiniseeriti 2x5 min vältel ksüloolis. Edasi rehüdreeriti koelõigud kahaneva kontsentratsiooniga alkoholireas (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%). Iga kontsentratsiooni juures hoiti lõikusid 2x1 min. Seejärel kanti lõikudele 2x1 minutiks ddH₂O. Fikseerimisel tekkinud valkudevaheliste ristsidemete eemaldamiseks asetati koelõigud 30 minutiks naatriumtsitraatpuhvrissse (10 mM, pH=6,0), 98°C juures. Lõike jahutati 20 minutit ning permeabiliseeriti 20 minutit 0,1% TritonX/PBS lahuses. Immunoglobuliini mittespetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti lõike 1 h vältel 5% kitseseerumiga 1% BSA/PBS lahuses. Lõike inkubeeriti üleöö niisutuskambris primaarsete antikehadega. Primaarsetest antikehadest kasutati küülikus valmistatud antikehi Laminiin-1 (Sigma Aldrich; lahjendus 1:500) ja Tbr1 polükloonaalset antikeha (Merck Millipore, lahjendus 1:200) ning hiires valmistatud Integriin-β1 (12G10) monokloonaalset antikeha (Santa Cruz; lahjendus 1:400), Nestin (2Q178) monokloonaalset antikeha (Santa Cruz; lahjendus 1:500) ja Pax6 (PAX6) monokloonaalset antikeha (Santa Cruz; lahjendus 1:500). Negatiivsele kontrollile kanti 1% BSA/PBS lahust.

Järgmisel päeval pesti lõike 3x5 minuti jooksul 1xPBT (PBS; 20% Tween-20) lahusega ning inkubeeriti sekundaarsete antikehadega Alexa *goat-anti-mouse* 555 ja *goat-anti-mouse* 488 (lahjendus 1:1000), Alexa *goat-anti-rat* 555 ja *goat-anti-rat* 488 (lahjendus 1:1000), Alexa *goat-anti-rabbit* 555 ja *goat-anti-rabbit* 488 (lahjendus 1:1000) (Molecular Probes, Eugene, OR) 1 h niisutuskambris pimedas 4°C juures. Lõike pesti 2x5 min PBT lahusega ja 2x5 min PBS lahusega ning inkubeeriti 2 minutit DAPI-ga (4',6-diamidino-2-fenüülindool) (Sigma Aldrich, lahjendus 1:1000), mis aitab rakkudes nähtavale tuua DNA. Seejärel pesti lõike taas 2x5 min PBS lahusega. Viimasena sulundati lõigud Fluoromount geeliga (Electron Microscopy

Sciences) ja kaeti ettevaatlikult katteklaasiga. Lõikude täieliku kuivamise vältimiseks lakiti katteklaaside servad läbipaistva lakiga.

2.2.7 Koelõikude pildistamine

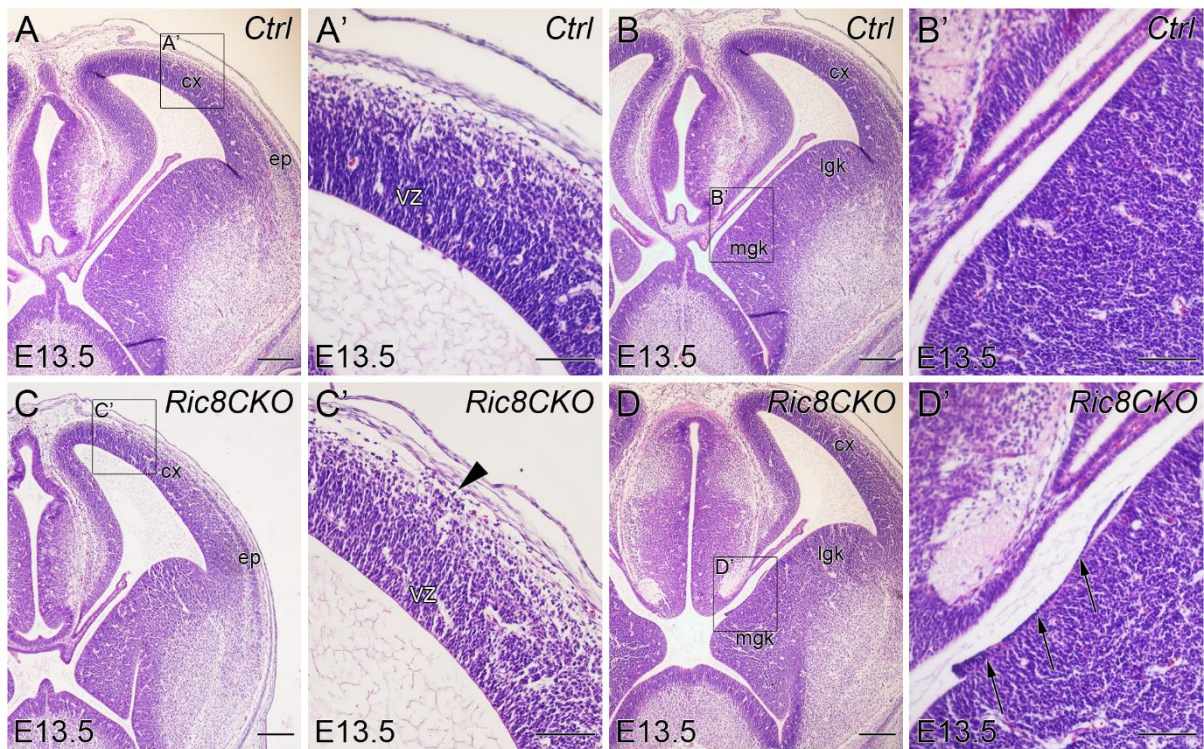
Histoloogilisi ja immuunohistokeemilisi preparaate pildistati ja analüüsiti mikroskoobiga Olympus BX51 Quantum, mis oli varustatud kaameraga Olympus DP71. Immuunohistokeemiliste preparaatide analüüsimiseks kasutati ka konfokaalmikroskoopi Olympus IX81 ning selle programmi Fluoroview™ FV1000. Saadud piltide järeltöötlemiseks ja dokumenteerimiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop CS4 11.0.

2.3 Tulemused

2.3.1 RIC8 puudus neuraalsetest eellasrakkudest põhjustab heterotoopiate teket vanuses E13.5

Antud bakalaureusetöös uuriti täpsemalt E13.5 vanuses olevaid neurospetsiifilisi *Ric8* mutantseid konditsionaalseid *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* (edaspidi *Ric8CKO*) embrüoid ning nende pesakonnakaaslasid. Varasemalt on leitud, et E12.5 vanuses *Ric8CKO* hiire embrüote otsajus märgatavaid erinevusi kontrollembrüotega võrreldes ei esine, kuid E14.5 ja vastsündinud *Ric8CKO* hiirtel ilmnevad ulatuslikud basaalmembraani defektid ning häired otsaju kihtide tekkes (Kask jt, 2015). Sellest tulenevalt oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks uurida ning määrata otsaju basaalmembraani defektide esmane ilmnemine arengus. Alustuseks uuriti E13.5 *Ric8CKO* embrüote otsaju morfoloogiat, milleks teostati peaaju histoloogilistel lõikudel hematoksüliin-eosiin värving. Tulemusi analüüsides leiti, et E13.5 kontrollembrüotel (n=3) on arenev neokorteks korrapärane ning tuvastatav oli ka tekkiv eelplaat (joonis 4A ja A'). *Ric8CKO* embrüotel (n=3) oli samuti näha tekkiv eelplaat (joonis 4C'), kuid suurema suurendusega oli märgata rakkude ebakorrapärane ja hõredam paiknemine (joonis 4C'). Lisaks oli kontrollhiirtel arenevate kelmete ja aju parenhüümi vahelises alas selgelt eristuv MZ. *Ric8CKO* otsaju lõikudelt oli tuvastatav samuti MZ, kuid leiti ka suuremaid rakukogumeid selles ehk rakud olid migreerunud BM-ist üle (joonis 4C', must nooleots). Peale selle teostati põhjalikum uuring ka teistele ajuosadele. Vaatluste tulemusena leiti neuraalsete rakkude ebaloosulikkude migreerumist ka ganglionikõrgendikul, kus *Ric8CKO* embrüotel oli näha periventrikulaarset heterotoopiat (joonis 4D ja D', mustad nooled), mida kontrollembrüotel ei esinenud (joonis 4B ja B'). Kõikidel katses kasutatud *Ric8CKO* embrüotel oli näha nii kortikaalseid kui ka periventrikulaarseid heterotoopiaid.

Nende tulemuste põhjal võib väita, et RIC8 puudus neuraalsetest eellasrakkudest mõjutab rakkude korrektset positsioneerimist juba vanuses E13.5.

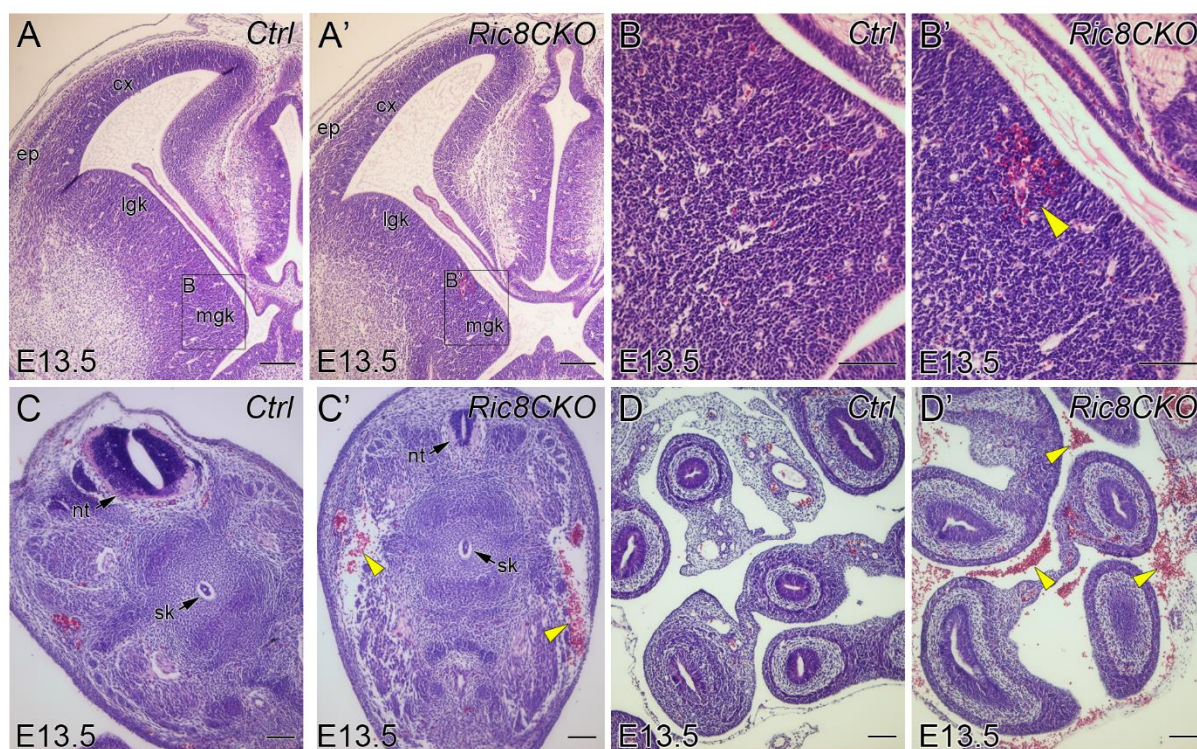


Joonis 4. E13.5 embrüote otsaju histoloogiline analüüs. Frontaallõik (A) kontrollembriote (*Ctrl*) ning (C) *Ric8CKO* embrüote otsaju piirkonnast. (A', C') Piltidel A ja C märgitud suurendatud väljalõiked. Frontaallõik (B) kontrollembriote (*Ctrl*) ja (D) *Ric8CKO* embrüote ganglionikõrgendiku piirkonnast. (B', D') Piltide B ja D suurendatud väljalõiked. (C') Musta nooleotsaga on *Ric8CKO* embrüotel tähistatud kortikaalne ektoopia. (D') *Ric8CKO* embrüotel on mustade nooltega märgitud periventrikulaarne heterotoopia ganglionikõrgendikul. Lühendid: cx – korteks; ep – eel-plaat; VZ – ventrikulaartsoon; lgk – lateraalne ganglioni kõrgendik; mgk – mediaalne ganglioni kõrgendik. Mõõtkava: kõigil piltidel 100 µm.

2.3.2 *Ric8CKO* hiireliinil esinevad ulatuslikud verevalumid kudede vahel

E13.5 vanuste *Ric8CKO* embrüote histoloogiliste preparaatide põhjalikumal uurimisel selgus ka, et mutantsete hiirte aju parenhüümi vahel oli näha üksikuid verevalumeid (joonis 5B'). Verevalumite juures on näha, et *Ric8CKO* hiirtel võib olla probleeme veresoonte läbilaskvusega, sest neuraalse koe rakkude vahele on sattunud hulgaliselt vererakke. Kontrollembriotel olid veresooned terved ning vererakud paiknesid veresoonte sisemuses. Sellest tulenevalt uuriti põhjalikumalt embrüo üldist veresoonekonna intaktsust ja võimalikke verevalumeid. Analüüsi tulemusena leiti, et *Ric8CKO* embrüote kaudaalsemas (sabapooles) piirkonnas esineb samuti katkevaid veresooni (joonis 5C', kollased noolepead), võrreldes kontrollembriotega (joonis 5C). Kõige ulatuslikumad verekogumid olid märgatavad *Ric8CKO* embrüote kõhuõõnes siseelundite ümbruses (joonis 5D', kollased noolepead), samas kui normaalsel juhul oli see piirkond praktiliselt verevaba (joonis 5D).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et RIC8 on oluline ka veresoonekonna korrektse arengul.



Joonis 5. E13.5 embrüote üldine histoloogiline analüüs veresoonte hindamiseks. Frontaallõigud kontrollembriote (*Ctrl*) (A) aju-, (C) saba- ja (D) kõhuõõne piirkonnast ning *Ric8CKO* embrüote (A') aju-, (C') saba- ja (D') kõhuõõne piirkonnast. (B, B') Piltidel A ja A' märgitud suurendatud väljalõiked. (B', C', D') Kollaste noolepeadega on märgitud verevalumid *Ric8CKO* embrüotel. Lühendid: cx – korteks; ep – eel-plaat; lgk – lateraalne ganglioni kõrgendik; mgk – mediaalne ganglioni kõrgendik; nt – neuraaltoru, sk – seljakeelik. Mõõtkava: (A, A') 200 µm, (B, B', C, C', D, D') 100 µm.

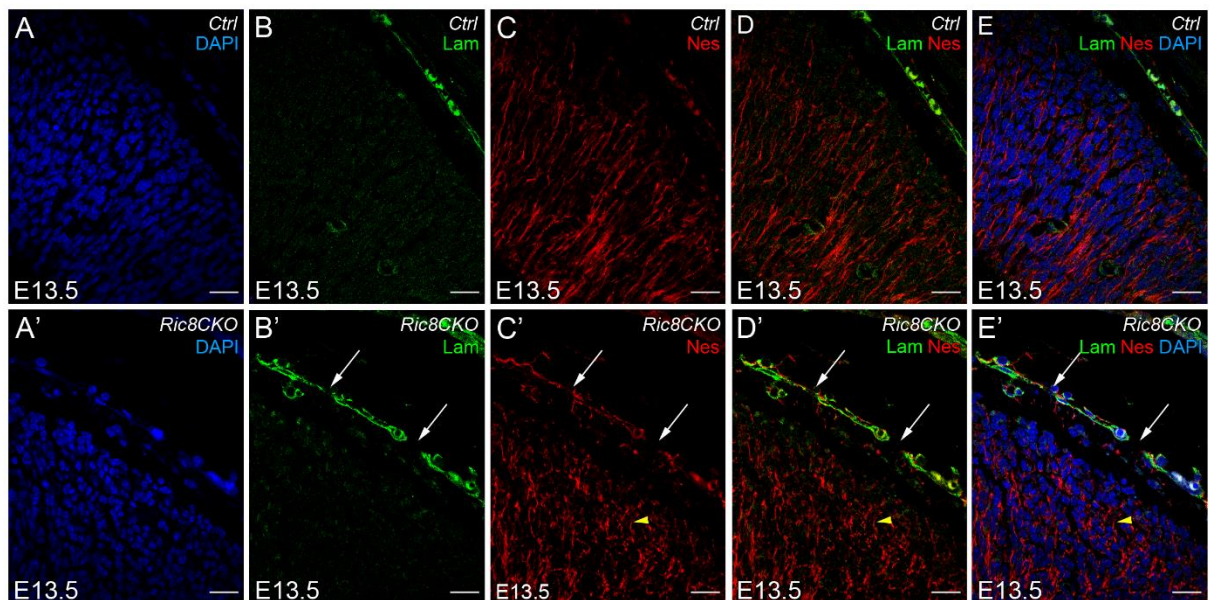
2.3.3 *Ric8CKO* hiireliinil esineb basaalmembraani katkeid ning radiaalgliia jätkete morfoloogia häireid

Histoloogilistelt preparaatidelt saadud info rakkude kortikaalsete heterotoopiate esinemise kohta innustas uurima *Ric8CKO* loomadel BM-i. Selleks teostati koelõikudele immuunohistokeemiline analüüs Laminiin-1 (Lam) ning Nestini (Nes) antikehadega ja DAPI-ga. Lamiinin-1 antikeha kasutati basaalmembraani märkimiseks, et tuvastada rakkude ülemigreerumise kohtades basaalmembraani katkendlikkust. Nestini antikeha kasutati radiaalgliia jätkete märkimiseks, et uurida radiaalgliia jätkete morfoloogiat ja ühendusi basaalmembraaniga. DAPI-ga märgiti ära rakkudes olev DNA. Katse tulemused näitasid, et kontrollembriotel (n=3) on basaalmembraanis olev Laminiin-1 lokalisatsioon ühtlane ning terviklik (joonis 6B) ja ka radiaalgliia jätked paiknevad radiaalselt (joonis 6C). Mutantsetel

Ric8CKO hiireembrüotel (n=3) oli basaalmembraanis oleva Laminiin-1 lokalisatsioon enamasti ühtlane, kuid leidis ka mitmeid fragmenteerunud ning katkendlikke Laminiin-1 piirkondi (joonis 6B', valged nooled).

Katsed Nestin antikehaga näitasid, et RGC basaalsed jätked ulatuvad VZ-st kiirjalt, radiaalselt pehmekesta suunas (joonis 6C). *Ric8CKO* hiire neokorteksi lõikudelt oli RGC jätkete paiknemine suuresti sarnane kontrollembriotega, kuid kohati olid tuvastatavad ka piirkonnad, kus radiaalne morfoloogia oli tugevasti häiritud (joonis 6C'). Selliseid jätkete morfoloogilisi muutusi oli märgata BM-i katkete olemasolul (joonis 6D'), kuid ka olukorras, kus Laminiin-1 lokalisatsiooni katkeid ei märkinud. Vaatamata neile defektidele ei olnud neis piirkondades tuvastatavad *Ric8CKO* heterotoopiad (joonis 6E').

Need tulemused näitavad, et RIC8 puudus mõjutab BM-i intaktsust vanuses E13.5 ning seeläbi ka RGC-de morfoloogiat.



Joonis 6. E13.5 embrüote otsaju immuunohistokeemiline analüüs. Frontaallõigud (A, B, C, D, E) kontrollembriote (*Ctrl*) ning (A', B', C', D', E') *Ric8CKO* embrüote otsaju piirkonnast. Valgete nooltega on tähistatud katked *Ric8CKO* basaalmembraanis. Kollase nooleotsaga on näidatud ebakorrapäraselt paiknevad radiaalgliia jätked. Sinisega on tähistatud DAPI, rohelisega Laminiin-1, punasega Nestin. Mõõtkava: kõikidel pildidel 20 µm.

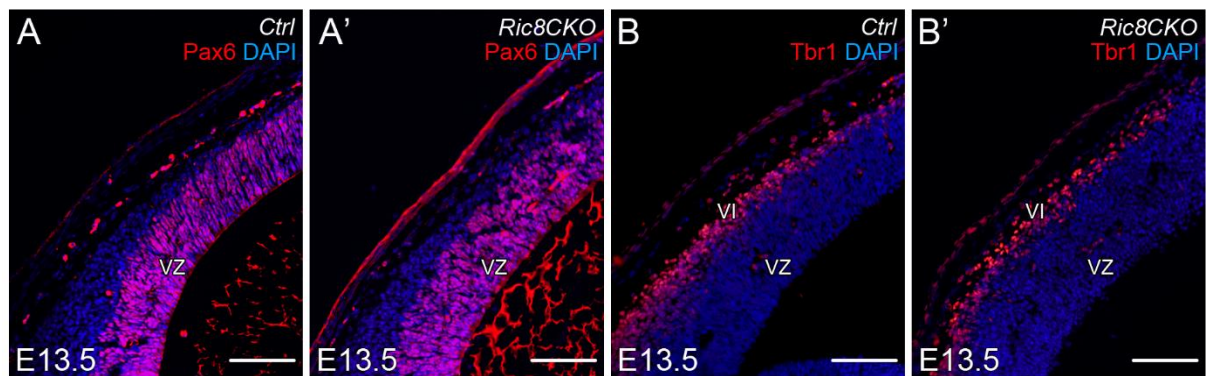
2.3.4 E13.5 vanustel *Ric8CKO* hiirtel on neokorteksi esimesed kihid tekkinud

Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli kindlaks teha, kas E13.5 vanuses hiireembrüotel on korrektselt välja arenenud neokorteksi VI kiht. Selle uurimiseks teostati

immuunohistokeemiline analüüs Pax6 (neuraalsete eellasrakkude marker) ja Tbr1 (VI kihi neuronite marker) antikehadega.

Katse tulemustest selgus, et kontrollembriotel (n=3) ja *Ric8CKO* embrüotel (n=3) on korrektselt välja arenenud eellasrakkude kiht ja VI neokorteksi kiht. Eellasrakke markeeriv Pax6 on kontrollembriotes tuvastatav VZ-s (joonis 7A). Sarnane Pax6 ekspressioon VZ-s on tuvastatav ka *Ric8CKO* embrüote otsajus (joonis 7A'). Neokorteksi VI kihi rakke märgistav Tbr1 lokaliseerub sarnaselt nii kontrollhiirte kui ka *Ric8CKO* hiirte areneva neokorteksi basaalses osas (joonis 7B ja B'). Siiski, nii Pax6 kui ka Tbr1 puhul on *Ric8CKO* embrüote neokorteksis märgata rakkude ebakorrapärasemat paigutust, võrreldes kontrollembriotega (joonis 7)..

Nende tulemuste põhjal võib öelda, et RIC8 puudus neuraalsetest eellasrakkudest ei mõjuta neuraalsete rakkude teket vanuses E13.5.



Joonis 7. E13.5 embrüote otsaju immuunohistokeemiline analüüs. Frontaallõigud (A, B) kontrollembriote (*Ctrl*) otsaju piirkonnast ning (A', B') *Ric8CKO* embrüote otsaju piirkonnast. Punasega on märgitud Pax6 ja Tbr1, sinisega DAPI (visualiseerib rakkude tuumi). Lühendid: VZ – ventrikulaartsoon; VI – 6. kihi neuronid. Mõõtkava: kõikidel piltidel 100 µm.

2.4 Arutelu

Varasemalt on uurimustöodes täheldatud, et *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* hiirte otsaju tervikliku BM-i moodustumine on häiritud, mille tulemusena tekivad vastsündinud hiirtel neurospetsiifilised väärarengud ning nad surevad sünnijärgselt (Kask jt, 2015). Neurogeneesi algfaasis E12.5 on nii kontroll- kui ka *Ric8*-mutantsete embrüote otsaju BM intaktne. Seevastu neurogeneesi tippfaasis E14.5 on *Nes;Ric8^{CKO}* embrüotel BM katkendlik ja fragmenteerunud ning märgata on ka rakkude ektoopilisi kogumeid marginaaltsoonis (Kask jt, 2015). Nendest tulemustest ajendatuna seati käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks uurida E13.5 vanuseid *Ric8CKO* hiiri, et kindlaks teha BM-i katkete esmane tekkimine ning kirjeldada sellest tulenevalt võimalikke neokorteksi morfoloogilisi erinevusi kontrollembriote ja *Ric8CKO* hiirte vahel.

Käesoleva töö tulemustena leiti, et juba E13.5 vanuses on *Ric8CKO* hiirtel detekteeritavad arenguhäired (nt kortikaalsed ektoopiad, periventrikulaarsed heterotoopiad) otsajukoore arengus. Kortikaalsed ektoopiad on tõenäoliselt põhjustatud progresseeruvate BM-i katkete tekkimise pärast. Varasemalt on sarnast fenomeni kirjeldatud *Ric8CKO* hiirtel vanuses E14.5 (neurogeneesi tippfaas) ja P0 (vastsündinud) (Kask jt, 2015). Selliseid neuraalse migratsiooni häireid on täheldatud mitmetes *knock-out* hiiremudelites. Näiteks GPR56, nagu ka RIC8, esineb neuraalsetes eellasrakkudes ja selle puudusel tekib *Ric8CKO* hiirte sarnane fenotüüp nii basaalmembraani kui ka radiaalgliia jätkete kinnitumise osas (Li jt, 2008). E13.5 vanustel *GPR56^{-/-}* embrüotel esinevad basaalmembraani katked, mistõttu võivad neuronid paikneda ektoopiliselt areneva korteksi anterioorses piirkonnas (Li jt, 2008). Samas erinevalt *Ric8CKO* embrüotest on esimesi basaalmembraani katkeid ja radiaalgliia jätkete lahti tulemist BM-ilt märgatud juba E12.8 vanustel *GPR56^{-/-}* embrüotel (Li jt, 2008). Lisaks on ektoopiate teket neokorteksis näidatud ka RIC8 interaktsioonipartner $G\alpha_{13}$ konditsionaalse hiireliiniga *Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox}*, kus kustutati neuraalsetest eellasrakkudest $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ (Moers jt, 2008). $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ puudusel on täheldatud E15.5 vanustel embrüotel neokorteksi morfoloogilisi defekte ning pindmise kihi rakkude migreerumist marginaaltsooni (Moers jt, 2008). Lisaks on näidatud, et ka *laminiin- β 2^{-/-}* ja *- γ 3^{-/-}* embrütel eksisteerivad sellised fenotüübilised eripärad alates E16.5 vanusest (Radner jt, 2013). Lamiini ühe peamise retseptori Integriin- β 1 välja lülitamine närvisüsteemist põhjustab samuti ventrikulaarset ektoopiat nii otsajus kui ka väikeajus alates E15.5 vanusest (Graus-Porta jt, 2001)

Lisaks ventrikulaarsele ektoopiale oli *Ric8CKO* embrüotel ganglionikõrgendiku piirkonnas märgatavad periventrikulaarsed heterotoopiad. Taoliste heterotoopiate teket on kirjeldatud raku migratsiooniks vajaliku *filamiin-A* mutantsetel loomadel (Mitchell jt, 2000).

Periventriukulaarse heterotoopia põhjuseks võib olla ka ebanormaalne eellasrakkude jagunemine periventrikulaarses regioonis, mida on kirjeldatud hallaine disorganiseerunud sõlmede moodustumisel (Eksioğlu jt, 1996). Eellasrakkude jagunemishäireid on kirjeldatud ka *Ric8CKO* hiireliinis (Kask jt, 2015). Periventrikulaarset heterotoopiat on palju seostatud epilepsiaga (Mitchell jt, 2002, Eriksson jt, 2002) ja suurenenud riskiga kardiovaskulaarsetele haigustele (de Wit jt, 2011).

Kirjandusest võib leida, et neuraalsete heterotoopiate peamiseks põhjuseks peaaegu on BM-i katked (Georges-Labouesse jt, 1998; Graus-Porta jt, 2001; Beggs jt, 2003; Kuo jt, 2005; Niewmierzycka jt, 2005; Li jt, 2008; Moers jt, 2008; Radner jt, 2013). BM on väga oluline, sest selle kaudu vahendatakse signaale migreeruvatele neuraalsetele rakkudele, et need asustaksid õigeid neokorteksi kihte (Yurchenco jt, 2011). Signaalide edastamise häirete puhul, näiteks BM-i katkendlikkuse puhul, ei saa migreeruvad rakud õigel ajal stopp-signaale ning jõuavad välja aju pinnale, kus nad moodustavad ektoopiaid. Taolised häired viivad *cobblestone*'i (tüüp II) lissentsefaalia väljakujunemisele. (Olson ja Walsh, 2002; Yurchenco jt, 2011) Tüüp II lissentsefaaliale omaseid rakkude ektoopiaid on uuritud erinevate hiiremudelite peal. Põhiliselt on kasutatud hiireliine, kus on häiritud pehmekelme membraani ja radiaalgliia jätkete vaheline signaaliülekanne integriinide või düstroglükaani vahendusel ning kus mutantsetel embrüotel on samuti tuvastatav neuraalsete rakkude ülemigreerumine, ning korteksi kihistumise häireid (Halfter jt, 2002; Myshrall jt, 2013) Antud töös märgati samuti, et juba E13.5 vanuses on *Ric8CKO* embrüotel tekkinud BM-i katked. Lisaks leiti, et *Ric8CKO* embrüote otsaju lõikudel esines radiaalgliia jätkete radiaalse paiknemise kõrval ebakorrapärast jätkete morfoloogiat. Varasemalt on leitud, et häired BM-i terviklikkuses võivad viia ka lühenenud RGC jätketeni (Halfter jt, 2002). $\beta 1$ -integriinid on seotud radiaalgliia jätkete kinnitumisega BM-ile ning $\beta 1$ -integriin^{-/-} embrüotel avaldub samuti katkendlik BM ja aberrantsed radiaalgliia jätked (Graus-Porta jt, 2001). RGC-d ja BM on omavahel tugevalt seotud, kuid ei teata veel täpselt, kas RGC jätkete lahti tulemine põhjustab BM-i katkendlikkust või põhjustab katkendlik BM jätkete lahti tulemist. Sündmuste järjekorda on üritatud kindlaks teha katsetega, kus neuraalsetest eellasrakkudest kustutati integriin- $\beta 1$ (Graus-Porta jt, 2001), fokaalne adhesioonikinaas (FAK, *focal adhesion kinase*) (Beggs jt, 2003), ILK (Niewmierzycka jt, 2005), $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ (Moers jt, 2008) või Laminiin- $\beta 2$ ja Laminiin- $\gamma 3$ (Radner jt, 2013). Käesoleva töö tulemusena leiti, et RGC jätkete ebanormaalne morfoloogia esines koos BM katketega, kuid leidis ka olukordi, kus RGC jätkete morfoloogia oli muutunud, kuid BM-i Laminiin-1 lokalisatsioon oli ühtlane. *Ric8* on *Ric8CKO* hiirtel välja lülitatud spetsiaalselt neuraalsetest eellasrakkudest (Kask jt, 2015), ning seetõttu on puudu ka RGC-dest. Kui arenevad RGC-d on defektsed, siis võivad neil

esineda ka häired BM-ile kinnitumisel, mistõttu võivad nad põhjustada BM-i katkemise. Edaspidi tuleks täpsemalt uurida RGC jätkete ühendusi BM-iga.

RGC jätkete ebanormaalne morfoloogia võib põhjustada ka häireid rakkude migreerumisel ning ebakorrapärase rakkude positsioneerumist. Antud töös ilmnis ebakorrapärase rakkude paigutust nii histoloogiliste kui ka immuunohistokeemilistel analüüsidel. Vanuses E13.5 võib toimuda ka rakkude migratsioonitüübi muutus, kus enne E13.5 esineb valdavalt tuuma translokatsioon, samas kui neokorteksi kihtide tekkimise ajal esineb suuresti RGC jätkete abil toimuv lokomotsiooni tüüpi liikumine, nn. radiaalne migratsioon (Gupta jt, 2002). Kui RGC jätkete morfoloogia on häiritud, võib see mõjutada ka neuronite migreerumist.

Rakkude ebakorrapärase paiknemise ning RGC jätkete morfoloogia muutuse tõttu uuriti varajase neokorteksi kihtide olemasolu vanuses E13.5. Katsete tulemusena leiti, et E13.5 vanuses ei ole neokorteksi kihtide moodustumine häiritud. Rakkude migreerumine neokorteksi kihtide moodustamiseks algab E13 vanuses, kui migreeruvad rakud moodustavad eel-plaadi (Olson jt, 2014). *Ric8CKO* embrüotel on olemas Tbr1 märgitud VI kihi neuronid, mis tekivad RGC-de jagunemisel. Häirunud ei ole ka neuraalsete eellasrakkude paiknemine VZ-s. Varasemalt on näidatud, et *RIC8* otseste seondumispartnerite $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ puudusel arenevas neokorteksis ei ole vanuses E14.5-E15.5 veel häireid neokorteksi kihtide moodustumises (Moers jt, 2008). Alates E16.5 on situatsioon muutunud, siis on ektoopiate juures täheldatav katkenud BM ning katketest läbi migreerunud neuronid (Moers jt, 2008). E14.5 vanustel hiirtel, kellel on neuraalsetest eellasrakkudest kustutatud ILK (mis see on?), olid tekkinud neokorteksi kihid VI ja V, kuid ektoopiate kohas olid need ebanormaalselt paigutatunud (Niewmierzycka jt, 2005).

Põhinedes kirjanduses leiduvatele andmetele võib öelda, et kui neuraalsetest eellasrakkudest on puudu mõni BM-i ja neokorteksi tekkeks oluline komponent, näiteks *RIC8A*, siis neurogeneesiks vajalike rakkude teke ei ole E13.5 vanuses häiritud.

Uudse tulemusena leiti histoloogiliste preparaatide analüüsil, et E13.5 vanuses *Ric8CKO* embrüote veresooned võivad olla defektsed. Tekkinud verevalumeid võis märgata nii ajus ganglionikõrgendikul kui ka embrüo sabapoolses piirkonnas ja kõhuõõnes. Aju tarbib umbes 10 korda rohkem energiat kui ülejäänud keha, mistõttu on oluline, et oleks tõhus veresoonestik aju hapniku ja toitainetega varustamiseks ning jääkainete eemaldamiseks. Kortikaalsed veresooned läbivad neokorteksit kindla nurga all ja hargnevad, et moodustada keeruline võrgustik. (Ma jt, 2013) Hapniku ja toitainete transporti ning jääkainete eemaldamist vahendab BM, mis koos veresoontega moodustab vere-aju barjääri BBB (Abbot jt, 2010). BM võimaldab

neuronitel ühenduda silelihasrakkudega ja seeläbi kontrollida aju verevahetust (Abbot jt, 2010). Lisaks rakk-rakk interaktsioonidele reguleerivad BBB omadusi ka ECM-iga koostoimimine, sest ECM-i võrgustik on ühenduses nii perivaskulaarsete astrotsüütide jätketega kui aju endoteeli rakkudega (Menezes jt, 2014). Ka *Ric8CKO* hiireliinil on P0 vanuses näidatud ajus verevalumeid, põletikulisi koldeid või lagunevat ajukude (Kask jt, 2015). Lisaks, Menezes jt on näidanud, et laminiin- $\alpha 2$ puudus *Lama2^{-/-}* embrüotes põhjustas gliooosi ja häirunud gliovaskulaarset morfoloogiat, mis arvatakse olevat tagajärg defektsele BBB-le. Samuti leidsid nad, et laminiini poolt vahendatud signaalid astrotsüütidelt ja peritsüütidelt on olulised BBB arenguks ja funktsioneerimiseks (Menezes jt, 2014). On näidatud, et peritsüüdid on neuraalharja rakkude päritolu (Winkler jt, 2011), mis annab alust arvata, et *Ric8CKO* hiirtes võivad need olla defektsed ning mõjutada seeläbi veresoonte terviklikkust.

Nendele andmetele tuginedes võib oletada, et kui neuraalsetest eellasrakkudest on puudu *Ric8* võib see põhjustada häireid BBB-s ja seeläbi tekitada ka verevalumeid ajus.

KOKKUVÕTE

Imetajatel on embrüonaalses arengus neokorteksil suur roll tunnetuslikes, õppimis- ja tajufunktsioonides ning teadvuses. Imetajate neokorteks on 6-kihiline struktuur, mis saavutatakse rakkude migreerumisel ventrikulaartsoonist lõplikule positsioonile. Lõpliku positsiooni määramisel on olulised nii radiaalgliia rakud kui basaalmembraan. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kas E13.5 võiks olla vanus, kus tekivad esimesed märgatavad erinevused konditsionaalsete *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* ja kontrollembriote neokorteksi arengus ja basaalmembraani terviklikkuses. E13.5 vanuses embriotel teostati hematoksüliin-eosiin värving, mille abil võrreldi otsajukoore histogeneesi. Immuunohistokeemilised analüüsid tehti E13.5 vanustele embriotele, mille põhjal analüüsiti *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embriote otsaju basaalmembraani intaktsust ja neokorteksi kihtide arengut.

Bakalaureusetöö kokkuvõteks saadi järgmised järeldused:

- Vanuses E13.5 on *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embriote otsajukoore histogenees häiritud ja märgatavad on kortikaalsed ektoopiad.
- E13.5 vanuste *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embriote basaalmembraanis ilmnevad katked.
- Vanuses E13.5 on *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embriote puhul märgata radiaalgliia jätkete ebanormaalset morfoloogiat.
- *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* hiireliinis esinesid verevalumid vanuses E13.5.

SUMMARY

Deletion of RIC-8A from neural precursor cells influences the integrity of basement membrane

Eva-Maria Oja

Summary

Central nervous system is an organ system with specific structure and function which processes the information from the organism and environment in order to regulate the behaviour and physiology of the organism. One of the most studied structures in the study of mammalian nervous system is the evolutionally new 6-layer neocortex, which plays an important role in coordinating the cognitive, learning and perception functions as well as consciousness.

However, the development of neocortex includes several complex processes which ensure the diversity of neural cells, the timely migration of cells and their accurate positioning in the cell layers. In the proper migration of cells, radial glial cells developing in the ventricular zone play an important role as they have long processes which are used by migrating neural cells to move to the correct layers of the developing neocortex. In addition to that, neocortex is covered by a basement membrane which functions as a barrier for the migrating cells. Disturbances in the development and completeness of the basement membrane lead to overmigration of cells and cause cobblestone or type II lissencephaly.

Various signalling pathways are important for the division, adhesion and migration of cells. One of such pathways is a transference mechanism of signals mediated by G-proteins where nucleotide exchange factor RIC8 is used to enhance the signal derived from the α -subunit of G-protein. RIC8 is of high importance in the neurogenesis of mice as the lack of the protein leads to the development of severe neuromuscular defects.

The aim of the present Bachelor's thesis lies in studying the neural precursor cells specific conditional *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* mice at the embryonic age E13.5 to observe the first significant variations in the development of neocortex and the completeness of the basement membrane between the mutant and control embryos. Staining with hematoxylin and eosin was used in order to compare the neocortex histogenesis of the *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embryos, and the immunohistochemical analysis was carried out to further study the intact basement membrane and the development of the neocortex layers.

The results of this study include the following:

- At the age E13.5 the neocortex histogenesis of the *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embryos is already disturbed and various cortical heterotopias are noticed.
- There are breaks in the basement membranes of E13.5 *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embryos.
- The E13.5 *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embryos show abnormal morphology in the processes of the radial glia.
- *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* mice also showed extravasations at the age E13.5

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Keiu Kaske ja Tambet Tõnissood huvitava lõputöö teema ja igakülgse abi eest.

Suured tänud ka ülejäänud laborikollektiivile.

Artiklid

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37(1): 13–25.

Anthony, T. E., Heintz, N. (2008). Genetic lineage tracing defines distinct neurogenic and gliogenic stages of ventral telencephalic radial glial development. *Neural. Dev.* 3: 30.

Bastiani, C., Mendel, J. (2006). Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook* 13: 1–25.

Beggs, H. E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K-A., Gorski, J., Jones, K. R., Sretavan, D., Reichardt, L. F. (2003). FAK Deficiency in Cells Contributing to the Basal Lamina Results in Cortical Abnormalities Resembling Congenital Muscular Dystrophies. *Neuron* 40: 501-514.

Bergers, G., Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncol.* 7(4): 452–464.

Bjomsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., Temple, S. (2015). It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Dev. Cell.* 32(4): 435–446.

Boullaran, C., Hwang, I. Y., Kamenyeva, O., Park, C., Harrison, K., Huang, Z., Kehrl, J. H. (2015). B Lymphocyte-Specific Loss of Ric-8A Results in a Gα Protein Deficit and Severe Humoral Immunodeficiency. *J. Immunol.* 195(5): 2090–2102.

Colognato, H., French-Constant, C., Feltri, M. L. (2005). Human diseases reveal novel roles for neural laminins. *Trends. Neurosci.* 28(9): 480–486.

Couwenbergs, C., Labbé, J. C., Goulding, M., Marty, T., Bowerman, B., Gotta, M. (2007). Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *J Cell Biol.* 179: 15–22.

David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaiche, Y. (2005). *Drosophila* Ric8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature Cell Biol.* 7: 1083–1090.

- de Wit, M. C. Y., de Coo, I. F. M., Lequin, M. H., Halley, D. J. J., Roos-Hesselink, J. W., Mancini, G. M. S. (2011). Combined cardiological and neurological abnormalities due to *filamin A* gene mutation. *Clin. Res. Cardiol.* 100: 45–50.
- Eksioglu, Y. Z., Scheffer, I. E., Cardenas, P., Knoll, J., DiMario, F., Ramsby, G., Berg, M., Kamuro, K., Berkovic, S. F., Duyk, G. M., Parisi, J., Huttenlocher, P. R., Walsh, C. A. (1996). Periventricular Heterotopia: An X-linked Dominant Epilepsy Locus Causing Aberrant Cerebral Cortical Development. *Neuron* 16: 77–87.
- Erickson, A. C., Couchman, J. R. (2000). Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 48(10): 1291–1306.
- Eriksson, S. H., Rydenhag, B., Uvebrant, P., Malmgren, K., Nordborg, C. (2002). Widespread microdysgenesis in therapy-resistant epilepsy – a case report on post-mortem findings. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103: 74–77.
- Franco, S. J., Müller, U. (2013). Shaping our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron* 77(1): 19–34.
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P. Y., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Tall, G. G. (2011). Ric-8 Proteins Are Molecular Chaperones That Direct Nascent G Protein α Subunit Membrane Association. *Sci. Signal* 4(200): 10.1126/scisignal.2002223.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N., Gansmüller, A. (1998). Essential role of $\alpha 6$ integrins in cortical and retinal lamination. *Curr. Biol.* 8: 983–986.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J. C., Müller, U. (2001). $\beta 1$ -Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron* 31: 367–379.
- Gupta, A., Tsai, L. H., Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: A genetic look at neocortical development. *Nature Rev. Genet.* 3(5): 342–355.
- Götz, M., Huttner, W. B. (2005). The Cell Biology of Neurogenesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6(10): 777–788.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y-P., Willem, M., Mayer, U. (2002). A Critical Function of the Pial Basement Membrane in Cortical Histogenesis. *J. Neurosci.* 22(14): 6029–6040.
- Halfter, W., Yip, J. (2014). An organizing function of basement membranes in the developing nervous system. *MOD* 133: 1–10.

- Hartenstein, V., Stollewerk, A. (2015). The Evolution of Early Neurogenesis. *Dev. Cell* 32(4): 390–407.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Götz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Dev. Biol.* 229: 15–30.
- Haubst, N., Georges-Labouesse, E., De Arcangelis, A., Mayer, U., Götz, M. (2006). Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Development* 133: 3245–3254.
- Kask, K., Ruisu, K., Tikker, L., Karis, K., Saare, M., Meier, R., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2015). Deletion of RIC8A in Neural precursor Cells Leads to Altered Neurogenesis and Neonatal Lethality of Mouse. *Devel. Neurobio.* 75: 984–1002.
- Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzman, L., Romo, X., Garcia, M. A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., Hinrichs, M. V., Olate, J. (2003). Human brain synembryon interacts with G_{sa} and G_{qa} and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J. Cell. Physiol.* 195: 151–157.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W. B., Hevner, R. F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layer of cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 19(10): 2439–2450.
- Kriegstein, A. R., Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27(7): 392–399.
- Kriegstein, A. R. (2005). Constructing Circuits: Neurogenesis and Migration in the Developing Neocortex. *Epilepsia* 46(7): 15–21.
- Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., Cooper, J. A. (2005). Absence of Fyn and Src Causes a Reeler-Like Phenotype. *J. Neurosci.* 25(37): 8578–8586.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168–176.
- Li, S. Zhaohui, J., Koirala, S., Bu, L., Xu, L., Hynes, R. O., Walsh, C. A., Corfas, G., Piao, X. (2008). GPR56 Regulates Pial Basement Membrane Integrity and Cortical Lamination. *J. Neurosci.* 28(22): 5817–5826.

- Ma, S., Kwon, H. J., Huang, Z. (2012). Ric-8a, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Heterotrimeric G Proteins, Regulates Bergmann Glia-Basement Membrane Adhesion during Cerebellar Foliation. *J. Neurosci.* 32(43): 14979–14993.
- Ma, S., Kwon, H. J., Johng, H., Zang, K., Huang, Z. (2013). Radial glial Neural Progenitors Regulate Nascent Brain Vascular Network Stabilization via Inhibition of Wnt Signaling. *PLoS Biol.* 11(1): e1001469.
- Menezes, M. J., McClenahan, F. K., Leiton, C. V., Aranmolate, A., Shan, X., Colognato, H. (2014). *J. Neurosci.* 34(46): 15260–15280.
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell J. A., Johnson, C. D., Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:12593–12598.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for Gq α signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 27(2): 289–299.
- Miller, K. G., Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G α _o) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156(4): 1649–1660.
- Mitchell, L. A., Simon, E. M., Filly, R. A., Barkovich, A. J. (2000). Antenatal Diagnosis of Subependymal Heterotopia. *Am. J. Neuroradiol.* 21: 296–300.
- Mitchell, L. A., Thomas, P. Q., Zacharin, M. R., Scheffer, I. E. (2002). Ectopic Posterior Pituitary Lobe and Periventricular Heterotopia: Cerebral Malformations with the Same Underlying Mechanism? *Am. J. Neuroradiol.* 23: 1475–1481.
- Miyata, T., Kawaguchi, D., Kawaguchi, A., Gotoh, Y. (2010). Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20: 22–28.
- Moers, A., Nürnberg, A., Goebbels, S., Wettschureck, N., Offermanns, S. (2008). G α ₁₂/G α ₁₃ Deficiency Causes Localized Overmigration of Neurons in the Developing Cerebral and Cerebellar Cortices. *Mol. Cell. Biol.* 28(5): 1480–1488.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 427–437.
- Myshrall, T. D., Moore, S. A., Ostendorf, A. P., Satz, J. S., Kowalczyk, T., Nguyen, H., Daza, R. A. M., Lau, C., Campbell, K. P., Hevner, R. F. (2012) Dystroglycan on Radial Glia Endfeet

Is Required For Pial Basement Membrane Integrity and Columnar Organization of the Developing Cerebral Cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71(12): 1047–1063.

Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O., Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4(2): 143–150.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* 80: 249–257.

Niewmierzycka, A., Mills, J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., Reichardt, L. F. (2005) Integrin-Linked Kinase Deletion from Mouse Cortex Results in Cortical Lamination Defects Resembling Cobblestone Lissencephaly. *J. Neurosci.* 25(30): 7022–7031.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., Kriegstein, A. R. (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *J. Neurosci.* 22(8): 3161–3173.

Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neurosci.* 7(2): 136–144.

Olson, E. C., Walsh, C. A. (2002) Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Curr. Opin. Genetics Dev.* 12(3): 320–327.

Olson, E. C. (2014). Analysis of preplate splitting and early cortical development illuminates the biology of neurological disease. *Front. Pediatr.* 2: 121.

Pinto, L., Götz, M. (2007). Radial glial cell heterogeneity – The source of diverse progeny in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 83(1): 2–23.

Radner, S., Banos, C., Bachay, G., Li, Y. N., Hunter, D. D., Brunken, W. J., Yee, K. T. (2013). β 2 and γ 3 Laminins are Critical Cortical Basement Membrane Components: Ablation of *Lamb2* and *Lamc3* Genes Disrupts Cortical Lamination and Produces Dysplasia. *Dev. Neurobiol.* 73(3): 209–229.

Ramos, R. L., Siu, N. Y., Brunken, W. J., Yee, K. T., Gabel, L. A., Van Dine, S. E., Hoplight, B. J. (2014). Cellular and Axonal Constituents of Neocortical Molecular Layer Heterotopia. *Dev. Neurosci.* 36: 477–489.

- Reynolds, N. K., Schade, M. A., Miller, K. G. (2005). Convergent, RIC-8-Dependent G α Signaling Pathways in the *Caenorhabditis elegans* Synaptic Signaling Network. *Genetics* 169(2): 651–670.
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2013). Ablation of RIC8A Function in Mouse Neurons Leads to Severe Neuromuscular Phenotype and Postnatal Death. *PLoS ONE* 8(8): e74031
- Sillitoe, R. V., Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23: 549–577.
- Strome, S., Wood, W. B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 35: 15–25.
- Tall, G. G., Krumins, A. M., Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric G alpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278: 8356–8362.
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expr. Patterns.* 3: 591–594.
- Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav. Brain Res.* 167: 42–48.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* 239: 3404–3415.
- Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f. *J. Neurosci.* 25(15): 3793–3800.
- Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., Malnic, B. (2006). Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(24): 9310–9314.
- Winkler, E. A., Bell, R. D., Zlokovic, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature Neurosci.* 14: 1398–1405.
- Woodard, G. E., Huang, N. N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., Kehrl, J.H. (2010). Ric8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell Biol.* 30: 3519–30.

Yu, F., Kuo, C. T., Jan, Y. N. (2006). *Drosophila* Neuroblast Asymmetric Cell Division: Recent Advances and Implications for Stem Cell Biology. *Neuron* 51: 13–20.

Yurchenco, P. D. (2011). Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(2): a004911.

Raamatud

Kandel, E. R., Schwartz, J. H, Jessell, T. M. (eds.) 2000. The Induction and Patterning of the Nervous System, p. 1019–1020. *In* Principles of Neural Science, 4th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Veebiaadressid

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/101489>, külastatud 12.05.2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/237422>, külastatud 12.05.2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/177048>, külastatud 12.05.2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60626>, külastatud 12.05.2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55188>, külastatud 12.05.2016.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Eva-Maria Oja (sünnikuupäev: 16. märts 1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC-8A puuduse mõju basaalmembraani terviklikkusele,

mille juhendajad on Keiu Kask ja Tambet Tõnissoo

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016